

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ТЯЖЕСТИ ПОРАЖЕНИЯ КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ

Игорь Вячеславович КУЛИКОВ², Наталья Геннадьевна ЛОЖКИНА¹,
Владимир Николаевич МАКСИМОВ^{2,3}, Павел Сергеевич ОРЛОВ^{2,3},
Андрей Дмитриевич КУИМОВ¹, Михаил Иванович ВОЕВОДА^{2,3}

¹ ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

² ФГБУ НИИ терапии СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

³ ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

Изучена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), идентифицированных в недавних полногеномных ассоциативных исследованиях с одно- и многососудистым поражением коронарных сосудов у больных с острым коронарным синдромом (ОКС). Обследованы больные острым коронарным синдромом, поступившие в блок интенсивной терапии городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска (2009–2010 гг.), в том числе 175 мужчин, средний возраст $56,2 \pm 5,2$ года, и 105 женщин, средний возраст $62,1 \pm 5,3$ года. Диагноз ОКС устанавливался по совокупности критериев, разработанных Европейским обществом кардиологов и Американской коллегией кардиологов (2000). Вентрикулокоронарографию проводили на 1–3 сутки от развития симптомов ОКС. Полиморфизм генов тестировали с помощью ПЦР в реальном времени в соответствии с протоколом фирмы-производителя (зонды TaqMan, Applied Biosystems, USA). В исследование были взяты следующие ОНП: rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637. Для rs10757278 и rs1333049 выявлена ассоциация с многососудистым поражением коронарных артерий у пациентов с ОКС как в общей группе, так и при разделении по полу, для rs499818 – только в общей группе. Ассоциация rs2549513 со степенью поражения коронарных артерий показана только у мужчин. Впервые на российской популяции показана ассоциация ОНП rs10757278, rs499818, rs2549513, rs1333049 со степенью поражения коронарных артерий. В перспективе эти генетические маркеры могут быть использованы в составе риск-метра для оценки риска развития осложнений у пациентов с ОКС в российской популяции.

Ключевые слова: острый коронарный синдром (ОКС), тяжесть поражения коронарных артерий, rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637.

Высокая распространенность и смертность от острого коронарного синдрома в мире и в России обуславливают актуальность изучения данной проблемы. После установления диагноза острого коронарного синдрома (ОКС) необходимо оценить тяжесть состояния (прогноз) больного. Определение риска неблагоприятных исходов ОКС необходимо для выбора тактики лечения (медикаментозное, инвазивное или их сочетание), сроков пребывания больного в стационаре,

разработки индивидуальных программ реабилитации и вторичной профилактики. Внедрение математических методов моделирования прогноза исходов заболевания значительно облегчило задачу практическим врачам. Эти методы довольно легко воспроизводимы и специфичны в отношении той или иной нозологии. С другой стороны, чтобы прогностическая модель соответствовала поставленным задачам, она должна содержать наиболее значимые факторы, определяющие не-

Куликов И.В. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: 248945@mail.ru

Ложкина Н.Г. – к.м.н., ассистент кафедры факультетской терапии, e-mail: lozhkina.n@mail.ru

Максимов В.Н. – д.м.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, e-mail: medik11@mail.ru

Орлов П.С. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ генетики животных, e-mail: orlovpavel86@gmail.com

Куимов А.Д. – д.м.н., проф., зав. кафедрой факультетской терапии, e-mail: terapia@mail.ru

Воевода М.И. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, директор, e-mail: mvovoda@ya.ru

благоприятный исход заболевания. Что касается острого коронарного синдрома, то среди отдельных маркеров риска неблагоприятных исходов ОКС выделяются фракция выброса левого желудочка, «масса некроза миокарда», наследственная предрасположенность к ИБС, ранее выявленный 50 % и более стеноз коронарной артерии, отклонение сегмента ST, два приступа стенокардии и более в предыдущие 24 ч, повышенный уровень биомаркеров некроза миокарда и воспаления в сыворотке крови и некоторые другие [14].

Оценка такого важного фактора, как наследственность, долгое время ограничивалась лишь указанием на ее наличие. Позже стали проводиться ассоциативные исследования. Для анализа обычно отбирались ОНП (от единичных до нескольких десятков, иногда сотен) в функционально значимых генах [1]. Один из существенных недостатков такого подхода заключается в исключении из анализа участков ДНК, содержащих неидентифицированные гены, а также генов, продукты которых по современным представлениям не участвуют в развитии заболевания. В последние годы, благодаря быстрому совершенствованию технологий массового генотипирования, получили распространение полногеномные ассоциативные исследования. Принципиальными общими особенностями этих исследований являются анализ больших выборок пациентов и соответствующих контрольных групп (несколько тысяч индивидов), обязательное реплицирование анализа ассоциаций на независимо обследованных выборках и использование высокоразрешающих методов генотипирования, как правило, высокоплотных чипов для генотипирования по нескольким сотням тысяч генетических маркеров. Попыток выявить ассоциативные связи молекулярно-генетических маркеров с ближайшим и отдаленным прогнозом острого коронарного синдрома в мире, и особенно в России, пока недостаточно. Последнее обстоятельство ставит под сомнение правомочность имеющегося в настоящее время безоговорочного перенесения на нашу популяцию закономерностей развития патологических процессов, установленных при изучении популяций, отличающихся по этническому составу, характеру питания, занятости населения, ряду других факторов, и разработанных на их основе диагностических и лечебных рекомендаций. Все эти обстоятельства подчеркивают чрезвычайную актуальность проверки информативности генетических маркеров, отобранных в ходе полногеномного анализа, как дополнительных показателей риска неблагоприятного прогноза острого коронарного синдрома на нашей популяции. В связи с этим мы поставили цель изучить ассоциацию

8 ОНП с маркером неблагоприятного прогноза ОКС в виде одно- и многососудистого поражения коронарных сосудов (по данным венгерокулонокардиографии, выполненной по экстренным показаниям у больных с острым коронарным синдромом).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 280 больных острым коронарным синдромом, поступивших в блок интенсивной терапии городской клинической больницы № 1 г. Новосибирска в период с 1 апреля 2009 г. по 30 марта 2010 г., в том числе 180 пациентов с ОКС с подъемом сегмента ST (117 мужчин и 63 женщины) и 100 человек с ОКС без подъема сегмента ST (58 мужчин и 42 женщины). Средний возраст больных $59,1 \pm 6,1$ года (мужчин – $56,2 \pm 5,2$ года, женщин – $62,1 \pm 5,3$ года). Диагноз ОКС устанавливался по совокупности критериев, разработанных Европейским обществом кардиологов и Американской коллегией кардиологов (2000 г.), включающих: а) типичный болевой приступ; б) изменения ЭКГ в двух и более последовательных отведениях (высокоамплитудный Т, отрицательный Т, подъем сегмента ST, патологический Q, депрессия сегмента ST, наличие QR); в) динамические изменения в уровне ферментов (креатинкиназа, креатинкиназа МВ, сердечный тропонин Т и сердечный тропонин I). При дифференциальной диагностике между инфарктом миокарда без подъема сегмента ST и нестабильной стенокардией ориентировались на уровень кардиоспецифических маркеров. Q-позитивный инфаркт миокарда (ИМ) диагностирован у 219 больных (61 %), Q-негативный – у 39 больных (11 %), нестабильная стенокардия (НС) – у 78 человек (28 %), в том числе у мужчин соответственно в 68,8 % (80 человек), в 10,3 % (13 человек) и в 20,9 % (24 человека) случаев, у женщин – в 33,9 % (21 человек), в 30,9 % (20 человек) и в 35,2 % (22 человека) случаев. Венгерокулонокардиографию проводили по методике Judkins M., 1967 и Sones F.M., 1959 на 1–3 сутки от развития симптомов ОКС.

Геномную ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [2]. Генотипирование проводилось методом ПЦР в реальном времени (зонды TaqMan, Applied Biosystems, США) на приборе ABI 7900HT (Applied Biosystems) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. В исследование были взяты следующие ОНП: rs499818 (хромосома 6), rs619203 гена *ROS1*, rs10757278 и rs1333049 (хромосома 9), rs1376251 гена *TAS2R50*, rs2549513 (хромосома 16), rs4804611 гена *ZNF627* и

rs17465637 гена *MLAF3*. Они были отобраны по результатам исследований, подтвердивших ассоциацию этих ОНП с инфарктом миокарда.

Ассоциация ОНП со степенью поражения коронарного русла по данным венгерокуоронарографии (одно- и многососудистого) проверялась с помощью таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. В случае четырехпольных таблиц для сравнения выборок по частотам генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Относительный риск поражения коронарных артерий по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов (ОШ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

rs10757278 локализован на 9-й хромосоме, данные ряда исследований по ассоциации данного генетического маркера с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) противоречивы [5, 16].

При анализе полиморфизма rs10757278 без разбиения по полу были выявлены статистически значимые различия ($p < 0,001$) за счет меньшего объема поражения коронарных артерий у гомозигот по мутантному аллелю по сравнению с носителями двух других генотипов (табл. 1). Риск иметь поражение двух и более коронарных артерий у лиц с генотипами AA и AG в 7,8 раза выше, чем у носителей генотипа GG (ОШ = 7,8, 95-процентный доверительный интервал (95 %

ДИ) 2,89–21,23). При разбиении общей группы по полу у мужчин и женщин в отдельности данная зависимость сохраняется, соответственно $p = 0,001$ и $p = 0,014$.

rs499818 расположен на 6-й хромосоме. В Фрамингемском исследовании показана разная степень достоверных ассоциаций данного ОНП с рядом ССЗ [7], в исследовании [6] выявлена его этносpezifичность (отсутствие ассоциации у афроамериканцев и разная степень и более выраженная степень ассоциации с ИБС в молодом возрасте (< 55 лет)).

В нашем исследовании частоты генотипов данного ОНП достоверно различаются за счет преобладания большего объема атеросклеротического поражения коронарных артерий у пациентов с генотипом AA относительно носителей аллеля G ($p = 0,046$). Однако при разделении группы по полу статистической достоверности не выявлено за счет уменьшения объема анализируемой выборки (табл. 2).

Большинство исследований указывает на ассоциацию rs1333049, расположенного на 9-й хромосоме, с кардиоваскулярными заболеваниями и атеросклеротическим поражением [8, 12]. У пациентов с генотипом CC снижена реакция на вазодилататоры [1]. В исследовании [10] показана ассоциация C-аллеля с количеством бляшек в коронарных артериях, но не с утолщением комплекса «интима-медиа». По данным мета-анализа [11], в который было включено более 22 000 случаев ИМ и 60 000 контролей, выявлена высо-

Таблица 1

Частоты генотипов *Rs10757278* в группах с одно- и многососудистым поражением коронарных артерий

Генотип	Без разделения по полу, n/%		<i>p</i>	Женщины, n/%		<i>p</i>	Мужчины, n/%		<i>p</i>
	1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа	
AA	9/22,5	29/39,2	< 0,001	4/30,8	1/5,9	0,014	5/18,5	28/49,1	< 0,001
AG	13/32,5	38/51,4		4/30,8	14/82,4		9/33,3	24/42,1	
GG	18/45,0	7/9,4		5/38,4	2/11,7		13/48,2	5/8,8	

Примечание. Здесь и в табл. 2–4 1-я группа – однососудистое поражение, 2-я группа – многососудистое поражение; *p* – уровень значимости.

Таблица 2

Частоты генотипов *rs499818* в группах с одно- и многососудистым поражением коронарных артерий

Генотип	Без разделения по полу, n/%		<i>p</i>	Женщины, n/%		<i>p</i>	Мужчины, n/%		<i>p</i>
	1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа	
AA	0/0	7/9,6	0,134	0/0	3/17,6	0,137	0/0	4/7,1	0,185
AG	13/33,3	23/31,5		2/16,7	4/23,5		11/40,7	19/33,9	
GG	26/66,7	43/58,9		10/83,3	10/58,9		16/59,3	33/59,0	

Таблица 3

Частоты генотипов rs1333049 в группах с одно- и многососудистым поражением коронарных артерий

Генотип	Без разделения по полу, n/%		p	Женщины, n/%		p	Мужчины, n/%		p
	1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа	
GG	16/40,0	8/11,0	<0,001	4/30,8	1/5,9	0,058	12/44,4	7/12,5	0,002
CG	9/22,5	40/54,8		4/30,8	12/70,6		5/18,5	28/50,0	
CC	15/37,5	25/34,2		5/38,4	4/23,5		10/37,1	21/37,5	

Таблица 4

Частоты генотипов rs2549513 в группах с одно- и многососудистым поражением коронарных артерий

Генотип	Без разделения по полу, n/%		p	Женщины, n/%		p	Мужчины, n/%		p
	1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа		1-я группа	2-я группа	
AA	31/77,5	45/60,8	0,106	9/69,2	13/76,5	0,698	22/81,5	32/56,1	0,045
AC	9/22,5	27/36,5		4/30,8	4/23,5		5/18,5	23/40,4	
CC	0/0	2/2,7		0/0	0/0		0/0	2/3,5	

кая степень ассоциации rs1333049 с ССЗ, в том числе увеличение риска ИМ на 29 %. В другом мета-анализе [9] у 9961 мужчины и женщины, реплицированных на 6032 обследуемых, показана ассоциация данного ОНП со степенью кальцификации коронарных артерий. Определение степени кальцификации коронарных артерий методом компьютерной томографии является неинвазивным методом детекции коронарного атеросклероза, но не дает представления о локализации и степени вовлеченности коронарных артерий. Еще один проспективный мета-анализ подтверждает ассоциацию rs1333049 с ССЗ [13]. Однако в исследовании [16] не было найдено его ассоциации с повторным ИМ, реваскуляризацией и смертностью от ССЗ.

Нами показана ассоциация данного ОНП со степенью поражения коронарных артерий по результатам коронарной ангиографии ($p < 0,001$) в группе без разделения по полу за счет наименьшего поражения у гомозигот GG по сравнению с носителями аллеля С (ОШ = 5,4, 95% ДИ 2,1–14,3). У мужчин данная ассоциация более выражена (ОШ = 5,6, 95 % ДИ 1,8–16,7), у женщин не достигает уровня статистической значимости (табл. 3).

rs2549513 расположен на 16-й хромосоме. Согласно данным Фрамингемского исследования [7], этот ОНП ассоциирован с ИБС (ИМ, фатальная ИБС). В последней работе 2011 г. [6] показана ассоциация данного ОНП с коронарной болезнью сердца. В нашем исследовании обнаружена ассоциация rs2549513 со степенью поражения коронарных артерий только у мужчин ($p = 0,045$) за

счет большего объема поражения у носителей мутантного аллеля (ОШ = 3,4, 95 % ДИ 1,1–10,4). Для группы в целом и у женщин статистически значимых различий не выявлено (табл. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в России изучена ассоциация одного из известных маркеров неблагоприятного прогноза острого коронарного синдрома – многососудистого поражения коронарных сосудов с ОНП, которые, по данным литературы, ассоциированы с ССЗ (rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637). Для rs10757278 и rs1333049 выявлена ассоциация с многососудистым поражением коронарных артерий у пациентов с ОКС как в общей группе, так и при разделении по полу, для rs499818 – только в общей группе. Ассоциация rs2549513 со степенью поражения коронарных артерий показана только у мужчин.

В перспективе эти генетические маркеры могут быть использованы в составе дифференциального риск-метра для оценки риска осложнений у пациентов с ОКС российской популяции.

Исследование поддержано грантом РФФИ (проект № 11-04-01875а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малыгина Н.А., Костомарова И.В., Мелентьев А.С. и др. Связь I/D-полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента с наследственной предрасположенностью к инфаркту миокарда // Клини. мед. 2002. 80. (8). 25–29.

2. Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК // Анализ генома / Ред. К. Дейвис; пер. с англ. М.: Мир, 1990. 58–94.
3. Aschauer S., Mittermayer F., Wagner C.C. *et al.* Forearm vasodilator reactivity in homozygous carriers of the 9p21.3 rs1333049 G > C polymorphism // *Eur. J. Clin. Invest.* 2010. 40. (8). 700–705.
4. Biros E., Cooper M., Palmer L.J. *et al.* Association of an allele on chromosome 9 and abdominal aortic aneurysm // *Atherosclerosis*. 2010. 212. (2). 539–542.
5. Deka R., Koller D.L., Lai D. *et al.* FIA Study Investigators. The relationship between smoking and replicated sequence variants on chromosomes 8 and 9 with familial intracranial aneurysm // *Stroke*. 2010. 41. (6). 1132–1137.
6. Franceschini N., Carty C., Bůžková P., Reiner A. Association of genetic variants and incident coronary heart disease in multiethnic cohorts: the PAGE study // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011. 4. (6). 661–672.
7. Larson M.G., Atwood L.D., Benjamin E.J. *et al.* Framingham Heart Study 100K project: genome-wide associations for cardiovascular disease outcomes // *BMC Med. Genet.* 2007. 8. (Suppl. 1). S5.
8. Mendonça I., dos Reis R.P., Pereira A. *et al.* Independent association of the variant rs1333049 at the 9p21 locus and coronary heart disease // *Rev. Port. Cardiol.* 2011. 30. (6). 575–591.
9. O'Donnell C.J., Kavousi M., Smith A.V. *et al.* Genome-wide association study for coronary artery calcification with follow-up in myocardial infarction // *Circulation*. 2011. 124. (25). 2855–2864.
10. Plichart M., Empana J.P., Lambert J.C. *et al.* Single polymorphism nucleotide rs1333049 on chromosome 9p21 is associated with carotid plaques but not with common carotid intima-media thickness in older adults. A combined analysis of the Three-City and the EVA studies // *Atherosclerosis*. 2012. 222. (1). 187–190.
11. Preuss M., König I.R., Thompson J.R. *et al.* Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. CARDIoGRAM Consortium // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010. 3. (5). 475–483.
12. Scheffold T., Kullmann S., Hüge A. *et al.* Forschungsverbund Herz-Kreislauf in NRW (Research Consortium Heart and Circulation in North Rhine-Westphalia). Six sequence variants on chromosome 9p21.3 are associated with a positive family history of myocardial infarction: a multicenter registry // *BMC Cardiovasc. Disord.* 2011. 11. doi:10.1186/1471-2261-11-9.
13. Schunkert H., Götz A., Braund P. *et al.* Cardiogenics Consortium. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease // *Circulation*. 2008. 117(13). 1675–1684.
14. Tang E.W., Wong C.K., Herbison P. Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) hospital discharge risk score accurately predicts long-term mortality post acute coronary syndrome. // *Am. Heart J.* 2007. 153. (1). 29–35.
15. The chromosome 9p21 region and myocardial infarction in a European population // *Atherosclerosis*. 2011. 217. (1). 220–226.
16. Virani S.S., Brautbar A., Lee V.V. *et al.* Association of genetic variants and incident coronary heart disease in multi-ethnic cohorts. The PAGE Study // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2011. 4. (6). 661–772.

GENETIC MARKERS OF SEVERITY OF CORONARY VESSELS STENOSIS IN PATIENTS WITH ACUTE CORONARY SYNDROME

**Igor Vyacheslavovich KULIKOV², Natalya Gennadevna LOZHKINA¹,
Vladimir Nikolaevich MAKSIMOV², Pavel Sergeevich ORLOV³,
Andrey Dmitrievich KUIMOV¹, Mikhail Ivanovich VOEVODA²**

¹ *Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

² *Institute of Internal Medicine, SB of RAMS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

³ *Institute of Cytology and Genetics, SB of RAS
630090 Novosibirsk, Lavrentyev av., 10*

To investigate the association of SNP (identified in recent GWAS) with single and multi-vessel coronary arteries damage in patients with acute coronary syndrome (ACS). Two hundred eighty patients with ACS have been admitted to the intensive care unit at City Clinical Hospital № 1 (Novosibirsk). 175 men (mean age 56.2 ± 5.2 years), and 105 women (mean age – 62.1 ± 5.3 years) were examined. The diagnosis of ACS was defined according to the set of criteria developed by the European Society of Cardiology and American College of Cardiology (2000). Ventriculo–coronarography was performed in 1–3 days after ACS symptoms onset. Genomic DNA was extracted from venous blood by phenol-chloroform extraction. Polymorphism of genes tested by real-time PCR according to the protocol producer firms (probes TaqMan, Applied Biosystems, USA). The following SNPs: rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637 were taken for investigation. The association was found between rs10757278 and, rs1333049 and multivessel coronary artery disease in patients with ACS both in the total group and in case of gender differentiation. For rs499818 – only in the total group. The association of rs2549513 with degree of coronary artery lesions was revealed only for men. For the first time the association of SNPs rs10757278, rs499818, rs2549513, rs1333049 with the degree of coronary artery disease was detected in Russian population. In the future, these genetic markers can be used as a part of risk measuring research to assess the risk of complications in patients with ACS in Russian population.

Key words: acute coronary syndrome (ACS), coronary arteries damage, rs499818, rs619203, rs10757278, rs1333049, rs1376251, rs2549513, rs4804611, rs17465637.

Kulikov I.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: 248945@mail.ru

Lozhkina N.G. – candidate of medical sciences, assistant professor of the chair of internal diseases, e-mail: lozhkina.n@mail.ru

Maksimov V.N. – doctor of medical sciences, head of laboratory of molecular genetic studies of therapeutic diseases, e-mail: medik11@mail.ru

Orlov P.S. – junior researcher of the laboratory of molecular basis of animal genetics, e-mail: orlovpavel86@gmail.com

Kuimov A.D. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair of internal diseases, e-mail: terapia@mail.ru

Voevoda M.I. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMS, director, e-mail: mvoevoda@ya.ru